

24.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 5 日
Date of Application:

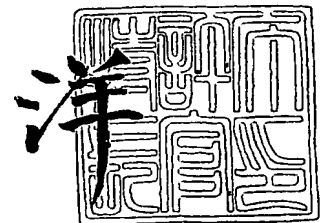
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 0 7 6 8 1
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 0 7 6 8 1]

出 願 人 中 外 製 薬 株 式 有 限 公 司
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 月 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 1 9 9 1 2

【書類名】 特許願
【整理番号】 032478
【提出日】 平成15年12月 5日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K
C08B

【発明者】
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
【氏名】 中村 輝郎

【発明者】
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内
【氏名】 下房地 剛

【特許出願人】
【識別番号】 000003311
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】
【識別番号】 100089705
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区
ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】
【氏名又は名称】 社本 一夫
【電話番号】 03-3270-6641
【ファクシミリ番号】 03-3246-0233

【選任した代理人】
【識別番号】 100076691
【弁理士】
【氏名又は名称】 増井 忠武

【選任した代理人】
【識別番号】 100075270
【弁理士】
【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】
【識別番号】 100080137
【弁理士】
【氏名又は名称】 千葉 昭男

【選任した代理人】
【識別番号】 100096013
【弁理士】
【氏名又は名称】 富田 博行

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 051806
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0107764

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

水と極性有機溶媒との混合溶媒中で、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸部分のカルボキシル基の30%以上が置換アミド基またはエステル基に変換される、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法。

【請求項 2】

前記水溶性ヒアルロン酸修飾物が薬物担体である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

前記水溶性ヒアルロン酸誘導体の哺乳動物における平均血中滞留時間が18時間以上である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 4】

水と極性有機溶媒との混合溶媒の混合比が、水：極性有機溶媒の容積比で95：1～20：80である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 5】

極性有機溶媒がN，N-ジメチルアセトアミド、エタノール、メタノール、ジメチルスルホキシド、N，N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジオキサン、アセトン、ピリジンおよびそれらの混合物から選択される、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の製造方法により得られる水溶性ヒアルロン酸修飾物。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物と薬物を含む水溶性ヒアルロン酸修飾物-薬物コンジュゲート。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物で表面修飾を施した治療用あるいは診断用の微粒子性薬物担体または医療用デバイス。

【請求項 9】

請求項 6 に記載の水溶性ヒアルロン酸修飾物を含む治療用あるいは診断用の微粒子性薬物担体または医療用デバイス。

【書類名】明細書

【発明の名称】薬物担体及びその製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物担体として有用な水溶性ヒアルロン酸修飾物、及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一般に、低分子薬物、ペプチド薬物、タンパク質薬物等の血中滞留性の向上、安定性の向上、溶解性の向上、抗原性の低減等を目的として、薬物と水溶性ポリマーとのコンジュゲーションが試みられている。特に、ポリエチレングリコール（PEG）は、その不活性な性質と生体内でのタンパク質による薬物の吸着を防ぐ効果を有することから広く用いられており、PEGコンジュゲート化タンパク質は医薬品として既に実用化の段階に入っている。しかし、PEGは生分解性ポリマーではない為、長期投与により体内に蓄積した場合の安全性等の問題は明らかでない。更には、最近、PEGコンジュゲート化リポソームにおいて投与2回目のクリアランスが異常に早い現象（Accelerated Blood Clearance現象、以下ABC現象とも称す）が報告されており（非特許文献1および2を参照）、PEGコンジュゲート化医薬品の安全性、有効性は十分に確立されたとは言い難い。

【0003】

一方、ヒアルロン酸（以下、HAとも称す）は、1934年、K. Meyerによって牛の眼の硝子体から単離された多糖であり、細胞外マトリックスの主成分として古くから知られている。ヒアルロン酸は、その化学的および物理的構造に種差が無く、ヒトにおいてもヒアルロン酸の代謝系が存在する。さらに免疫性または毒性の点に関しても最も安全な生体材料（Biomaterial）といえることができる。

【0004】

また近年、細胞の接着、増殖、移動の誘導に関するヒアルロン酸の生理活性物質としての側面が報告され注目されてきている。また、微生物による高分子量のヒアルロン酸の大量生産が可能となり、関節疾患治療薬などの医薬として実用化されており、化粧品等の分野においても実用化が進んでいる。さらに、薬物をヒアルロン酸とコンジュゲートすることで、薬物の癌組織へのターゲティング（特許文献1を参照）、肝臓へのターゲティング（特許文献2を参照）、抗原性の低減（特許文献3を参照）、血中滞留時間の延長（特許文献4、5および6を参照）等が達成できるという報告がなされている。

【0005】

汎用されているPEGと比べて、薬物のコンジュゲート担体としてヒアルロン酸を用いる際の利点は、生分解性を有する点、巨大サイズ化が可能な点、さらに、1分子中に多くの反応点を持つため、複数の薬物（同一薬物を複数、或いは2種類以上の薬物）を1分子中に担持できるということである。このような利点を有するヒアルロン酸を薬物コンジュゲート担体として用いることは、ターゲティング、徐放等、より高度な薬物動態制御機能を持つコンジュゲートを設計開発の手段となる。また、ヒアルロン酸は生分解性である上に、その化学的構造に種差が無いことから、安全性という点においてもPEGよりも優れた担体であるといえる。

【0006】

一方で、HA自体の血中滞留時間は短く、静脈内注射（以下、ivとも称す）で半減期が2分であると報告されている（非特許文献3を参照）。本発明者の検討でも、ただ単にヒアルロン酸を薬物にコンジュゲートしただけでは、薬物の血中滞留時間の大きな延長や、薬効の持続性の向上は確認されなかった。

【0007】

ヒアルロン酸の主代謝部位は肝臓およびリンパ腺であり、その代謝は、主にCD44、RHAMM、HARE等のヒアルロン酸に特異的に結合する細胞膜局在レセプターを介し

た細胞内への取り込みとそれに引き続くヒアルロニダーゼによる分解によるものである。これらの分子は共に、ヒアルロン酸の連続した遊離のカルボキシル基（6糖）を主な認識部位にしていることが報告されている（非特許文献4を参照）。

【0008】

血中滞留時間が短いというヒアルロン酸の問題を克服すべく、ヒアルロン酸に置換基を導入したヒアルロン酸修飾物を薬物担体として利用する試みもある（特許文献4、5および6を参照）。一般に、ヒアルロン酸に置換基を導入すればその血中滞留時間は延長され、その程度は置換基の導入率と相関すると考えられる。ヒアルロン酸の様々な位置に置換基が導入されたヒアルロン酸修飾物が報告されているが、その中でも、ヒアルロン酸レセプターとの結合阻害に最も効果のあるグルクロン酸のカルボキシル基に、加水分解速度の遅いアミド結合を介して置換基が導入されたHA修飾物が血中滞留時間の面から優れていると考えられる。しかしながら、本発明者の検討では、このようなヒアルロン酸修飾物を合成するに際し、一般的にヒアルロン酸修飾物の合成において汎用されている方法に従って、水中での脱水縮合反応によりヒアルロン酸に置換基を導入した場合、ヒアルロン酸のカルボキシル基の修飾率は最大でも約70モル%程度である上、このヒアルロン酸のカルボキシル基を最大限修飾したヒアルロン酸修飾物であっても実用的な薬物担体としては不十分なものであった。例えば、薬物担体としては大きな分子量を有するヒアルロン酸（分子量60万ダルトン）を用い、そのカルボキシル基の73モル%を修飾したヒアルロン酸修飾物であっても、ラットにおける平均血中滞留時間（MRT）は16時間程度でしかなく、実用的な薬物担体としては不十分であった。

【0009】

一方、ヒアルロン酸をテトラブチルアンモニウム塩にし、ジメチルスルホキシド中での反応により置換基を導入することによって、ヒアルロン酸のカルボキシル基を100%アミド化したヒアルロン酸修飾物が得られることも報告されている（特許文献7を参照）。しかしながら、当該ヒアルロン酸修飾物においては疎水性の高い置換基を導入しているため、導入率の上昇に伴ってヒアルロン酸修飾物の水溶性は低下しており、体内に投与することを目的とした水溶性の薬物担体としては適さない。また、100%アミド化したHA修飾物はもはやヒアルロン酸としての特性を残しておらず、ヒアルロン酸が本来持つ生体材料としての長所を失っている。

【0010】

これら以外にも、水と極性有機溶媒の混合溶媒中で、ヒアルロン酸のカルボキシル基に置換基を導入した例も報告されている（特許文献8を参照）。しかしながら、得られたヒアルロン酸修飾物について、血中滞留時間の延長が見られるかどうかについては一切触れられておらず、また、この発明においては置換基の導入率は10%以下であり、この程度の置換基の導入率では血中滞留時間の延長された実用的な薬物担体を得ることはできない。

【0011】

このように、薬物担体として実用的な水溶性ヒアルロン酸修飾物、特に血中滞留時間を実用的なレベルまで延長した水溶性ヒアルロン酸修飾物は知られておらず、その製造方法も知られていなかった。

【特許文献1】国際公開WO92/06714号パンフレット

【特許文献2】特開2001-81103号公報

【特許文献3】特開平2-273176号公報

【特許文献4】特開平5-85942号公報

【特許文献5】国際公開WO01/05434号パンフレット

【特許文献6】国際公開WO01/60412号パンフレット

【特許文献7】特表2002-519481号公報

【特許文献8】国際公開WO94/19376号パンフレット

【非特許文献1】Int. J. Pharm. 第255巻、第167-174頁、2003年

【非特許文献2】 J. Control. Rel. 第88巻、第35-42頁、2003年

【非特許文献3】 J. Inter. Med. 第242巻、第27-33頁、1997年

【非特許文献4】 Exp. Cell Res. 第228巻、第216-228頁、1996年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

発明が解決しようとする課題は、薬物担体として実用的な水溶性ヒアルロン酸修飾物、及びその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者は、かかる問題点を解決する為に鋭意研究を進めたところ、水と極性有機溶媒との混合溶媒中で、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシ基に置換基を30モル%以上導入することにより得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物が、従来の水溶性ヒアルロン酸修飾物では得られない実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長できることを見出し、本発明を完成させた。

【0014】

すなわち本発明の一つの側面によれば、水と極性有機溶媒との混合溶媒中で、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸部分のカルボキシ基の30%以上が置換アミド基またはエステル基に変換される、水溶性ヒアルロン酸修飾物の製造方法が提供される。

【0015】

本発明の別の側面によれば、当該製造方法により得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、当該水溶性ヒアルロン酸修飾物と薬物を含む水溶性ヒアルロン酸修飾物-薬物コンジュゲートもまた提供される。

【0016】

本発明のさらに別の側面によれば、当該水溶性ヒアルロン酸修飾物で表面修飾を施した治療用または診断用の微粒子性薬物担体または医療用デバイスもまた提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、当該水溶性ヒアルロン酸を含む治療用あるいは診断用の微粒子薬物担体または医療用デバイスもまた提供される。

【0017】

以下、本発明を更に具体的に説明する。

本発明に用いられるヒアルロン酸(HA)はヒアルロン酸骨格を有していれば特に限定されず、ヒアルロン酸の一部を誘導体化したヒアルロン酸誘導体や、ヒアルロン酸及びヒアルロン酸誘導体の塩(ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩、等)なども含まれる。

【0018】

本発明に用いられるヒアルロン酸は、どのような製造方法により得られたヒアルロン酸であってもよく、例えば、動物組織から抽出されたヒアルロン酸、発酵法で得られたヒアルロン酸、化学合成で得られたヒアルロン酸など、その由来は限定されない。

【0019】

水と極性有機溶媒との混合溶媒において、水と極性有機溶媒との混合体積比率は、99/1~20/80、好ましくは95/5~40/60である。使用される極性有機溶媒は水と上記比率で混和するものであれば特に限定されないが、例えば、エタノール(以下、EtOHとも称す)、N,N-ジメチルアセトアミド(以下、DMAcとも称す)、メタノール、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジオキサン、アセトン、ピリジンおよびそれらの混合物等が挙げられる。好ましくは、エタノール、ジメチルアセトアミドである。

【0020】

本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物において、置換アミド基またはエステル基に変換されているカルボキシル基の割合は、カルボキシル基修飾率として以下の式：

【化1】

$$(\text{カルボキシル基修飾率}) = \frac{(\text{各分子中の修飾されたカルボキシル基の合計数})}{(\text{各分子中のグルクロン酸の合計数})} \times 100$$

により算出される。実用的な血中滞留時間を得るため、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物のカルボキシル基修飾率は30%以上であることが好ましく、50%以上であることがさらに好ましい。修飾率が100%に近づく程、HAとしての特性が実質上失われ、本発明の長所が活かされなくなることから、最大修飾率は90%程度が好ましい。例えば当該ヒアルロン酸修飾物の修飾率は、30%～90%、より具体的には50%～80%である。カルボキシル基の修飾率は、プロトンNMRで定量することができる。

【0021】

また、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物の分子量も、その体内動態に大きく影響する。本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物の血中滞留時間は、一般にヒアルロン酸の分子量にも依存し、分子量の大きなヒアルロン酸ほどその血中滞留時間は遅い。従って、水溶性ヒアルロン酸修飾物の分子量およびカルボキシル基の修飾率を変化させることで、当該修飾物の血中滞留時間を制御することが可能である。本発明に用いられる原料のヒアルロン酸の分子量は特に制限されないが、余りに低分子量では得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物の血中滞留時間が短くなる。逆に、余りに高分子量になると得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物の粘度が非常に高くなり、高濃度での投与が難しくなる。また、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物の血中滞留時間は分子量が一定以上大きくなるとほとんど変化しなくなるので、通常、原料のヒアルロン酸の分子量は5000ダルトン～100万ダルトンであることが好ましく、1万ダルトン～30万ダルトンであることがより好ましく、8万ダルトン～30万ダルトンであることがさらに好ましい。尚、ヒアルロン酸重量平均分子量の測定方法については、光散乱法、粘度法等、各種の公知の方法を利用することができる。

【0022】

本発明の製造方法により得られる水溶性ヒアルロン酸修飾物の血中滞留時間は、原料HAの血中滞留時間に比べて延長されているものであることが好ましい。ここで、血中滞留時間は、平均血中滞留時間（以下、MRTとも称す）、血中半減期（以下、 $t_{1/2}$ とも称す）、血中クリアランス（以下、CLとも称す）などの公知の代表的なパラメーターを利用して適宜比較することができる。本発明製造方法により得られる水溶性ヒアルロン酸修飾物のヒトを含む哺乳類における血中滞留時間は、実用面から平均血中滞留時間（MRT）が18時間以上のものであることが好ましく、30時間以上のものがより好ましい。

【0023】

本発明において、HAまたはその誘導体に置換基を導入する部位は、HAレセプターとの結合阻害に最も効果のあるグルクロン酸のカルボキシル基である。水酸基に置換基を導入した場合は、HAレセプターとの結合阻害効果が低く、また、エステル結合となることが多いため、体内での半減期が短く（1日程度）、血中滞留時間の延長目的には適さない。カルボキシル基への置換基の結合様式としては、エステル結合と比べて加水分解速度の遅いアミド結合が好ましい。

【0024】

ヒアルロン酸またはその誘導体に含まれるグルクロン酸のカルボキシル基に導入される置換基としては、置換基導入後に得られるヒアルロン酸修飾物が水溶性であれば特に制限されない。本発明のヒアルロン酸修飾物が有する置換基はどのような置換基であってもよいが、得られたヒアルロン酸修飾物の水溶性を保持するために、親水性の置換基または疎水性の低い置換基を導入することが好ましい。

【0025】

本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物は、特に限定はされないが、例えば10mg/mL

～1000 mg/mLの水に対する溶解度を有する。実際に治療を目的として投与される時のヒアルロン酸修飾物の濃度は10～500 mg/mL程度であるので、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物の溶解度は、好ましくは生理食塩水に対して10 mg/mL以上である。

【0026】

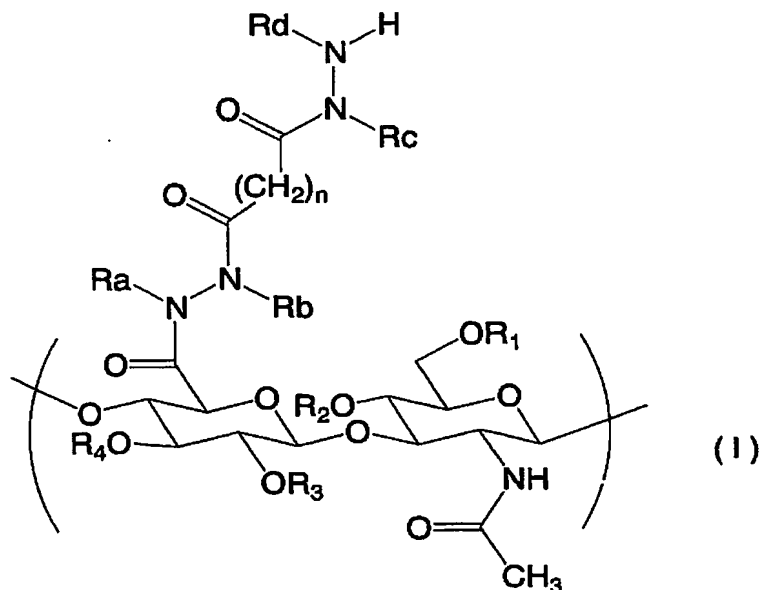
置換基の具体的な例としては、例えば、保護されたあるいは遊離のヒドロキシル基、アミノ基、ヒドラジド基、メルカプト基、カルボキシル基、アルデヒド基などの官能性置換基を有してもよい直鎖もしくは分岐したアルキル、アルコキシ、アルケン、アリール、アルキレンオキシド、シクロアルキル、複素環などを挙げることができる。これらの置換基は最終的には生体内でHAから遊離してくるので、安全性の高いものが好ましい。例えば、アミノ酸、ペプチド、分子量1万ダルトン以下のジアミノPEG、アジピン酸ジヒドラジド等が挙げられる。置換基が目的の割合で導入されたHAの製造は当業者に公知の方法を用いて行うことができる。例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(以下、EDCとも称す)でヒアルロン酸のカルボキシル基にエチレンジアミン(以下、EDAとも称す)、リジン、グリシン等のアミノ酸やアジピン酸ジヒドラジド(以下、ADHとも称す)を縮合、修飾する場合は、EDCのヒアルロン酸に対する添加量および反応溶液中ヒアルロン酸濃度で置換基の導入量を調節できる。例えば、ヒアルロン酸またはその誘導体に含まれるカルボキシル基に対して、EDCなどの縮合剤は0.1～5モル倍、特に1～4モル倍の量を用いることができ、ADHなどの試薬は、ホモ2官能性試薬の場合は20～100モル倍、1官能性試薬またはヘテロに官能性試薬の場合は0.3～20モル倍、特に0.5～5モル倍の量を用いることができる。

【0027】

本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物には、例えば式(I)：

【0028】

【化2】



(式中、R₁、R₂、R₃ および R₄ は、それぞれ独立に、水素原子、C₁ - 6 アルキル基または C₁ - 6 アルキルカルボニル基であり、

R_a、R_b、R_c および R_d は、それぞれ独立に、水素原子または C₁ - 6 アルキル基であり、

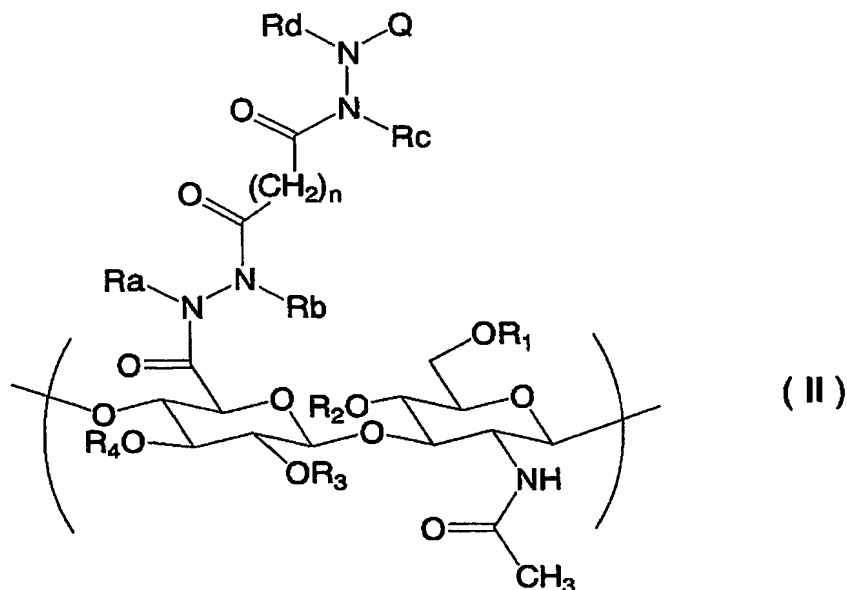
n は、0～12 の整数である。)

で表される繰り返し構造を有するヒアルロン酸修飾物；

式(II)：

【0029】

【化3】



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d および n は、既に定義したとおりであり、

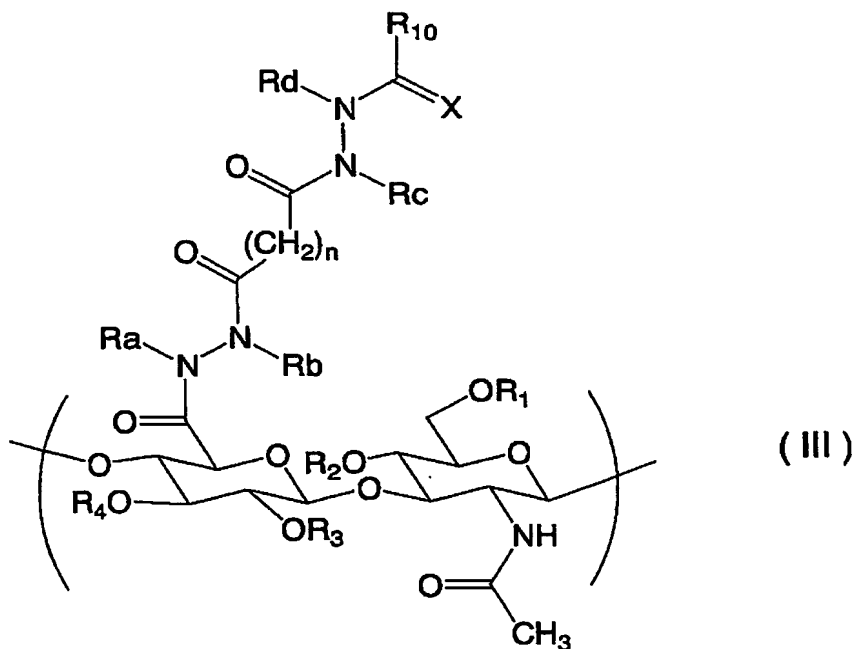
Q は、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトンまたはこれらの共重合体から選択されるポリマーであり、該ポリマーは末端のカルボキシル基で窒素原子と結合している。)

で表される繰り返し構造を有するヒアルロン酸修飾物；および

式 (III) :

【0030】

【化4】



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d および n は、既に定義したとおりであり、

X は、 O または NH であり、

R_{10} は、 $C_2 - 6$ アルケニル、メルカプト $C_1 - 6$ アルキルまたはカルボキシル $C_1 - 6$ アルキルである。)

で表される繰り返し構造を有するヒアルロン酸修飾物が含まれる。

【0031】

また、置換基が導入された水溶性HA修飾物の電荷に関しては、導入された置換基が、カチオン性であった場合、トータルの電荷がプラス側に振れ、血中滞留時間の短縮に繋がるため、血中滞留時間を延長する場合には修飾電荷はノニオン性か、アニオン性であることが好ましい。

【0032】

本発明の水溶性HA修飾物の調製方法は、既知のカルボキシル基修飾方法を用いることができる。例えば、HAのカルボキシル基をエチレンジアミン(EDA)やアジピン酸ジヒドラジド(ADH)を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)で縮合させ、アミノ基修飾されたHA(以下、HA-AMとも称す)、あるいはヒドラジド基(以下、HZ基とも称す)で修飾されたHA(以下、HA-HZとも称す)を合成する。この際、アミノ基、HZ基は、例えば無水コハク酸等で処理、カルボキシル基に戻してトータル電荷をアニオンにした方が血中滞留時間の延長に好ましい。あるいは、同様の方法で、アミノ酸、ペプチド等のアミノ基で修飾しても良い。

【0033】

本発明の水溶性HA修飾物は薬物担体として用いることができる。担持される薬物は特に限定されず、低分子化合物、タンパク質、ペプチド等を用いることが可能である。また、薬物を担持させるにおいては、公知の各種の方法を用いることができ、薬物を本発明の水溶性HA修飾物中に封入してもよく、薬物と本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物とをコンジュゲートにしてもよい。

【0034】

低分子化合物の例としては、例えば、制癌剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド等)、免疫抑制剤、抗炎症剤(ステロイド剤、非ステロイド剤系抗炎症剤、等)、抗リウマチ剤、抗菌剤(β -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、サルファ剤、等)などを挙げることができる。

【0035】

タンパク質、ペプチドの例としては、例えば、エリスロポエチン(EPO)、グラニューロサイトコロニー刺激因子(G-CSF)、インターフェロニン α 、 β 、 γ 、(INF α 、 β 、 γ)、トロンボポエチン(TPO)、シリアリーニュートロフィクファクター(CNTF)、チューマーネクロシスファクター(TNF)、チューマーネクロシスファクター結合タンパク質(TNFbp)、インターロイキン-10(IL-10)、FMS類似チロシンカイネース(Flt-3)、成長ホルモン(GH)、インシュリン、インシュリン類似成長因子-1(IGF-1)、血小板由来成長因子(PDGF)、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)、ブレイン由来ニューロトロフィクファクター(BDNF)、ケラチノサイト成長因子(KGF)、幹細胞因子(SCF)、メガカリオサイト成長分化因子(MGDF)、オステオプロテゲリン(OPG)、レプチン、副甲状腺ホルモン(PTH)、塩基性フィブロblast成長因子(b-FGF)、骨形成タンパク質(BMP)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、抗体、ダイアボディー等を挙げることができる。

【0036】

さらに、本発明の水溶性HA修飾物と薬物とからなるコンジュゲートの調製方法は、既知のポリマーとタンパク質のコンジュゲートで使用されている方法を用いることができる。例えば、上述のアミノ基修飾されたHA(HA-AM)、あるいはヒドラジド基修飾されたHA(HA-HZ)を合成、この一部をN-Succinimidyl 3-[2-pyridyldithio]propionate(SPDP)と反応させ、メルカプト基を導入したHA(HA-SH)を調製する。この際、余剰のアミノ基、HZ基は、例えば無水コハク酸等で処理、カルボキシル基に戻してトータル電荷をアニオン性にした方が好ましい。一方で、タンパク質にマレイミド基

、ビニルスルホン基等チオールと特異的に反応する官能基を導入する。例えば、マレイミドブチリロキシスルフォサクシンエーテルでタンパク質のアミノ基にマレイミド基を導入、これをHA-SHと反応させコンジュゲートを調製すればよい。

【0037】

ここで、このコンジュゲートにおいて、コンジュゲートの生物活性を有効に保つために、タンパク質と水溶性HA修飾物主鎖間のスペーサーの長さを調節したり、部位特異的なコンジュゲートとすることもできる。

【0038】

また、本発明の水溶性HA修飾物は薬物とのコンジュゲート以外にも、高分子ミセル、リポソーム、ナノ微粒子等の微粒子性薬物キャリアーにおいて、そのステルス化のための表面修飾に用いることもできる。ここで「表面修飾」とは他の合成高分子、天然高分子、脂質、金属、セラミックスあるいはそれらの複合体などからなる物質の表面に、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を化学的に結合または物理的に吸着させ、当該物質の最表面に本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物が存在している状態を指す。例えば、本発明の水溶性HA修飾物とPLGA等の疎水性高分子を結合させた化合物を含む高分子ミセルや、本発明の水溶性HA修飾物をリン脂質に結合させたりポソーム、あるいは、本発明の水溶性HA修飾物に疎水性分子を結合させ、疎水性相互作用で疎水性微粒子表面をコートした微粒子等が挙げられる。

【0039】

本発明における「治療用または診断用の微粒子薬物担体」とは、疾患の治療または診断のために用いられる微粒子状の薬物担体をいう。当該担体の粒径は特に限定はされないが、例えば1nm~200μmである。

【0040】

また、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物自体を、多価官能性化合物を架橋剤に用いてゲル化させ生理活性物質を内包した薬物担体、あるいは外科手術後の癒着防止剤などの医療用デバイスの成分とすることもできる。本発明における「医療用デバイス」とは、疾患の治療または診断、あるいはそれらの補助に用いられるデバイスであれば特に限定されず、例えば人工臓器、インプラント、カテーテル、薬物内包ゲル、薬物内包ペレットなどが含まれる。

【発明の効果】

【0041】

本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を用いることで、従来の水溶性ヒアルロン酸修飾物では得られない実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長することが可能である。従って、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を担体に用い、薬物をコンジュゲート化することで、従来の技術では達成できなかった、実用的でかつ安全な医薬組成物を提供することが可能である。

【実施例】

【0042】

以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕 混合溶媒中でのヒアルロン酸修飾物の合成

混合溶媒でヒアルロン酸修飾物を合成する際に用いる有機溶媒および混合比率の変化させた場合の、得られるヒアルロン酸修飾物の酵素分解性を確認するために以下の手順により、ヒアルロン酸修飾物を合成した。なお、以下特に断らない場合は、溶媒の混合比は容積比で表示するものである。また、ヒアルロン酸修飾物中に残存するヒドラジド基の定量は、トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)によるアミノ基の定量法(以下、TNBS法とも称す)により行なった。TNBS法の具体的手順は、「学会出版センター 生物化学実験法12 蛋白質の化学修飾<上> 初版」37ページに記載の方法(TNBS法)に従った。ただし、既知濃度の酢酸ヒドラジド溶液を標準物質とし、TNBS溶液は0.5Mに調製し、ヒドラジド基を定量するために500nmの吸光度を測定した。

(実施例 1-1)

分子量 2.5×10^4 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウム (HA) (電気化学工業株式会社製) 14.0 mg を、0.1% 濃度で蒸留水/EtOH = 50/50 に溶解し、5 N 塩酸で pH を 4.7 ~ 4.8 に調整した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) とアジピン酸ジヒドラジド (ADH) を、HA のユニット (1 ユニット = 繰り返し単位である N-アセチルグルコサミン-グルクロン酸) : EDC : ADH = 1/5/40 モル比になるよう添加し、5 N 塩酸で pH を 4.7 ~ 4.8 に保ちながら室温で 2 時間反応させた。大過剰量の 100 mM 塩化ナトリウム溶液、25% エタノール溶液、蒸留水に対して順に透析 (スペクトラポア 7、分画分子量 (MWCO) : 12k-14k ダルトン) し、凍結乾燥して標題のヒドラジド基 (HZ 基) が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) 11.5 mg を得た。

(実施例 1-2)

混合溶媒として蒸留水/EtOH = 80/20 を用いたほかは実施例 1-1 と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) 13.2 mg を得た。

(実施例 1-3)

混合溶媒として蒸留水/EtOH = 95/5 を用いたほかは実施例 1-1 と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) 14.1 mg を得た。

(実施例 1-4)

混合溶媒として蒸留水/DMAc = 50/50 を用いたほかは実施例 1-1 と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) 12.8 mg を得た。

(実施例 1-5)

混合溶媒として蒸留水/DMAc = 80/20 を用いたほかは実施例 1-1 と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) 13.8 mg を得た。

(実施例 1-6)

混合溶媒として蒸留水/DMAc = 95/5 を用いたほかは実施例 1-1 と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) 14.0 mg を得た。

(比較例 1-1)

溶媒として蒸留水のみを用いたほかは実施例 1-1 と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) 13.1 mg を得た。

【0043】

実施例 1-1 ~ 1-6、比較例 1-1 で得られた HA-HZ 中の HZ 基導入率を ADH 導入率としてプロトン NMR 法で定量した (HA : N-アセチル基、1.85 ppm、HZ : ADH 由来の 4 つのメチレン、1.5、2.1 および 2.25 ppm)。結果を表 2 に示す。

【0044】

【表 1】

表 1

	反応溶媒	原料	収量	HZ (%)
		HA (mg)	HA-HZ (mg)	(NMR)
比較例 1-1	水	14.0	13.1	52
実施例 1-1	50 % EtOH	14.0	11.5	71
実施例 1-2	20 % EtOH	14.0	13.2	63
実施例 1-3	5 % EtOH	14.0	14.1	51
実施例 1-4	50 % DMAc	14.0	12.8	68
実施例 1-5	20 % DMAc	14.0	13.8	56
実施例 1-6	5 % DMAc	14.0	14.0	52

なお、NMRの測定はNMR分光計としてJNM-ECA500（500MHz分光計）を使用し、溶媒としてD₂Oを用い、以下の条件（パラメーター）で行なった：

Data points (X point) : 16384

Spectral width (X sweep) : 15 ppm

Acquisition time (X acq time) : 1.749秒

Pulse delay (Relaxation delay) : 30秒

Transients (Scans) : 64

温度：周囲温度

〔実施例 2〕薬物動態試験用ヒアルロン酸修飾物の合成

（実施例 2-1）HA-HZの調製

分子量 2.5×10^4 ダルトンのHA（電気化学工業株式会社製）84.0mgを、0.1%濃度で蒸留水/EtOH=50/50に溶解した。HAのユニット：EDC：ADH=1：4：40モル比になるよう添加し、5N塩酸でpHを4.7～4.8に保ちながら室温で2時間反応させた。大過剰量の100mM塩化ナトリウム溶液、25%エタノール溶液、蒸留水に対して順に透析（スペクトラポア7、分画分子量（MWCO）：12k-14kダルトン）し、凍結乾燥してヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸（HA-HZ）86.6mgを得た。得られたHA-HZのNMRスペクトル測定結果を図1に示す。

（実施例 2-2）

分子量 2×10^5 ダルトンのHA 76.0mgを用いたほかは実施例 2-1と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸（HA-HZ）57.0mgを得た。得られたHA-HZのNMRスペクトル測定結果を図2に示す。

（実施例 2-3）

分子量 6×10^5 ダルトンのHA 76.0mgを用いたほかは実施例 2-1と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸（HA-HZ）73.6mgを得た。得られたHA-HZのNMRスペクトル測定結果を図3に示す。

（比較例 2-1）

分子量 2.5×10^4 ダルトンのHAを1%の濃度で蒸留水に溶解したほかは実施例 2-1と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸（HA-HZ）を得た。

（比較例 2-2）

分子量 2×10^5 ダルトンのHAを0.5%の濃度で蒸留水に溶解したほかは実施例 2-1と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸（HA-HZ）を得た。

(比較例 2-3)

分子量 6×10^5 ダルトンの HA を 0.25% の濃度で蒸留水に溶解したほかは実施例 2-1 と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

【0045】

実施例 2-1 ~ 2-3、比較例 2-1 ~ 2-3 で得られた HA-HZ 中の HZ 基導入率をプロトン NMR 法で定量した (HA: N-アセチル基、1.85 ppm; HZ: ADH 由来の 4 つのメチレン、1.5、2.1 および 2.25 ppm の積分値から算出)。結果を表 2 に示す。

【0046】

【表 2】

表 2

	反応溶媒	HA 分子量	原料	収量	HZ 導入率 (%) (NMR)
			HA (mg)	HA-HZ (mg)	
比較例 2-1	水	2.5×10^4 Da	213.9	229.0	56
実施例 2-1	50 % EtOH	2.5×10^4 Da	84.0	86.6	63
比較例 2-2	水	2×10^5 Da	128.6	120.2	63
実施例 2-2	50 % EtOH	2×10^5 Da	76.0	57.0	67
比較例 2-3	水	6×10^5 Da	119.7	111.2	61
実施例 2-3	50 % EtOH	6×10^5 Da	76.0	73.6	66

【実施例 3】薬物動態試験用の蛍光標識 HA-HZ の合成

(実施例 3-1)

実施例 2-1 で得られた HA-HZ (38.9 mg) を、2 mg/mL 濃度で 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解した。HA のユニット (1 ユニット = 繰り返し単位である N-アセチルグルコサミン-グルクロン酸) に対して 0.15 モル倍のフルオレセイン イソチオシアネート (以下、FITC と称す) を HA-HZ 溶液の 1/10 容量のジメチルスルホキシド (以下、DMSO と称す) 溶液として加えて室温で 1 時間攪拌した。脱塩カラム PD-10 で未反応の FITC を除去した後、HA のユニットに対して 40 モル倍の無水コハク酸を PD-10 で粗精製した溶液の 1/10 容量の DMSO 溶液として加えた。室温で 1 時間攪拌して反応させた後、大過剰量の水に対して透析して精製し、凍結乾燥して実施例 2-1 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (実施例 3-1: 38.0 mg) を得た。

(実施例 3-2)

実施例 2-2 で得られた HA-HZ 40.9 mg を用いたほかは実施例 3-1 と同様の方法で、実施例 2-2 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (実施例 3-2: 40.2 mg) を得た。

(実施例 3-3)

実施例 2-3 で得られた HA-HZ 41.1 mg を用いたほかは実施例 3-1 と同様の方法で、実施例 2-3 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (実施例 3-3: 42.5 mg) を得た。

【0047】

実施例 3-1 ~ 3-3 で得られた各蛍光標識 HA-HZ を 0.25 mg/mL 濃度で 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解し、その溶液の 494 nm における吸光度から FITC 濃度を定量し、以下の式に従って各ユニットの濃度を算出した。さらに、モル分率への変換、HA 修飾物中の HA 由来の重量分率算出を行った。

未修飾 HA ユニット: x nmol/mLHA-SUC ユニット: y nmol/mL (残存 HZ が無水コハク酸処理されたユニット)式 1: $(379.3 \times x) + (635.57 \times y) + (924.88 \times (\text{FITC conc.})) = 250 \text{ mg}$ 式 2: $x / (y + (\text{FITC conc.})) = (100 - \text{HZ} (\%)) / \text{HZ} (\%)$

得られた結果を表3にまとめた。

【0048】

【表3】

表3. 薬物動態試験用FITC標識HA-HZ

HA-HZ	HZ (%)	残存 HZ (%)	HA-FITC ユニット	HA-SUC ユニット	未修飾 HA ユニット	HA (重量 %)
	NMR	TNBS	(モル %)	(モル %)	(モル %)	
実施例3-1	63	-	1.5	62	37	71.4
実施例3-2	67	-	1.2	66	33	69.8
実施例3-3	66	-	1.5	65	34	70.2

- : 定量限界以下

(比較例3-1)

分子量 2.5×10^4 ダルトンのHA (電気化学工業株式会社製) を1.0%濃度で蒸留水に溶解し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に調整した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド) (EDC) とアジピン酸ジヒドラジド (ADH) を、HAのユニット:EDC:ADH=1:0.1:40のモル比になるよう添加し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に保ちながら室温で2時間反応させた。大過剰量の100mM塩化ナトリウム溶液、25%エタノール溶液、蒸留水に対して順に透析 (スペクトラポア7、分画分子量 (MWCO):12k-14kダルトン) し、凍結乾燥してヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

(比較例3-2)

反応に用いたHAのユニット:EDC:ADHの比を1:1:40としたほかは比較例3-1と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

(比較例3-3)

反応に用いたHAのユニット:EDC:ADHの比を1:5:40としたほかは比較例3-1と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

(比較例3-4)

分子量 1.9×10^5 ダルトンのHAを0.5%濃度で蒸留水に溶解したほかは比較例3-1と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

(比較例3-5)

分子量 1.9×10^5 ダルトンのHAを0.5%濃度で蒸留水に溶解したほかは比較例3-2と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

(比較例3-6)

分子量 1.9×10^5 ダルトンのHAを0.5%濃度で蒸留水に溶解したほかは比較例3-3と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

(比較例3-7)

分子量 5.8×10^5 ダルトンのHAを0.25%濃度で蒸留水に溶解したほかは比較例3-1と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

(比較例3-8)

分子量 5.8×10^5 ダルトンのHAを0.25%濃度で蒸留水に溶解したほかは比較例3-2と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

(比較例3-9)

分子量 5.8×10^5 ダルトンのHAを0.25%濃度で蒸留水に溶解したほかは比較例3-3と同様の方法で、ヒドラジド基が導入されたヒアルロン酸 (HA-HZ) を得た。

【0049】

比較例 3-1~3-9 で得られた HA-HZ 中の HZ 導入率を ADH 導入率としてプロトン NMR 法で定量したところ、それぞれ HA のカルボキシル基の 3% (比較例 3-1)、42% (比較例 3-2)、59% (比較例 3-3)、6% (比較例 3-4)、49% (比較例 3-5)、71% (比較例 3-6)、8% (比較例 3-7)、56% (比較例 3-8)、73% (比較例 3-9) に HZ 基が導入されていた。

(比較例 4-1) 比較例 3-1 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-1 で得られた HA-HZ (25.6 mg) を水に溶解させた後、等量の 100 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) を加えて終濃度を 1 mg/mL に調整した。これに FITC/HA のユニット = 3.0 mol/mol の仕込比で、HA-HZ 溶液の 1/10 容量の DMSO に溶解させた FITC を添加し、室温、遮光下に 1 時間反応させた。反応溶液 25 mL を予め 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) で平衡化した PD-10 カラム (10 本) に投入し、未反応の FITC を除去した。TNBS 法で、HZ 基の残存量を確認した後、精製した溶液に無水コハク酸/HZ = 250 mol/mol の仕込比で、3.5 mL の DMSO に溶解させた無水コハク酸を添加し同様に反応させた。反応混合物を大過剰量の水に対して透析精製し、凍結乾燥して比較例 3-1 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-1; 18.3 mg) を得た。

(比較例 4-2) 比較例 3-2 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-2 で得られた HA-HZ 24.0 mg を用いたほかは比較例 4-1 と同様の方法で、比較例 3-2 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-2; 18.9 mg) を得た。

(比較例 4-3) 比較例 3-3 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-3 で得られた HA-HZ 23.2 mg を用いたほかは比較例 4-1 と同様の方法で、比較例 3-3 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-3; 18.4 mg) を得た。

(比較例 4-4) 比較例 3-4 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-4 で得られた HA-HZ (25.0 mg) を水に溶解させた後、等量の 100 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) を加えて終濃度を 1 mg/mL に調整した。これに FITC/HA のユニット = 0.5 mol/mol の仕込比で、HA-HZ 溶液の 1/10 容量の DMSO に溶解させた FITC を添加し、室温、遮光下に 1 時間反応させた。反応溶液 25 mL を予め 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) で平衡化した PD-10 カラム (10 本) に投入し、未反応の FITC を除去した。TNBS 法で HZ 基の残存量を確認した後、精製した溶液に無水コハク酸/HZ = 80 mol/mol の仕込比で、3.5 mL の DMSO に溶解させた無水コハク酸を添加し同様に反応させた。反応混合物を大過剰量の水に対して透析精製し、凍結乾燥して比較例 3-4 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-4; 19.2 mg) を得た。

(比較例 4-5) 比較例 3-5 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-5 で得られた HA-HZ 23.7 mg を用いたほかは比較例 4-1 と同様の方法で、比較例 3-5 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-5; 20.0 mg) を得た。

(比較例 4-6) 比較例 3-6 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-6 で得られた HA-HZ 25.0 mg を用いたほかは比較例 4-1 と同様の方法で、比較例 3-6 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-6; 19.0 mg) を得た。

(比較例 4-7) 比較例 3-7 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-7 で得られた HA-HZ (23.5 mg) を水に溶解させた後、等量の 100 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) を加えて終濃度を 1 mg/mL に調整した。これに FITC/HA unit = 0.3 mol/mol の仕込比で、HA-HZ 溶液の 1/10 容量の DMSO に溶解させた FITC を添加し、室温、遮光下に 1 時間反応させた。反応溶液 25 mL を予め 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) で平衡化した PD-10 カラム (10 本) に投入し、未反応の FITC を除去した。TNBS 法で、HZ 基の残存量を確認した後、精製した溶液に無水コハク酸/HZ = 40 mol/mol の仕込比で、3.5 mL の DMSO に溶解させた無水コハク酸を添加し同様に反応させた。反応混合物を大過剰量の水に対して透析精製し、凍結乾燥して比較例 3-4 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-7; 20.7 mg) を得た。

(比較例 4-8) 比較例 3-8 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-8 で得られた HA-HZ 25.0 mg を用いたほかは比較例 4-1 と同様の方法で、比較例 3-8 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-8; 22.6 mg) を得た。

(比較例 4-9) 比較例 3-9 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ の合成

比較例 3-9 で得られた HA-HZ 25.3 mg を用いたほかは比較例 4-1 と同様の方法で、比較例 3-9 の HA-HZ を FITC 標識した蛍光標識 HA-HZ (比較例 4-9; 19.2 mg) を得た。

【0050】

比較例 4-1 ~ 4-9 で得られた各蛍光標識 HA-HZ を 0.25 mg/mL 濃度で 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解し、以下、実施例 3 と同様に分析、評価した。得られた結果を表 4 にまとめた。

【0051】

【表 4】

表 4. 薬物動態試験用 FITC 標識 HA-HZ

HA-HZ	HZ (%) NMR	残存 HZ (%) TNBS	HA-FITC ユニット (モル %)	HA-SUC ユニット (モル %)	未修飾 HA ユニット (モル %)	HA (重量 %)
比較例 4-1	3	-	1.06	1.94	97.00	99.75
比較例 4-4	6	-	1.35	4.65	94.00	98.24
比較例 4-7	8	-	1.48	6.52	92.00	97.15
比較例 4-2	42	-	1.36	40.64	58.00	79.30
比較例 4-5	49	-	1.50	47.50	51.00	76.57
比較例 4-8	56	-	1.77	54.23	44.00	74.14
比較例 4-3	59	-	1.22	57.78	41.00	72.56
比較例 4-6	71	-	1.25	69.75	29.00	68.55
比較例 4-9	73	-	1.09	71.91	27.00	67.80

-: 定量限界以下

【試験例 1】 混合溶媒中で調製した HA-HZ の酵素分解性評価

実施例 1-4、1-5 および 1-6、ならびに比較例 1-1 で得られた HA-HZ を 0.5 mg/mL 濃度に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) に溶解した。この溶液 80 μ L にヒアルロニダーゼ SD (生化学工業株式会社製) 0.5 U/mL 溶液 32 μ L を加えて 37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした。対象として酵素非添加群も同様に行った。それぞれゲル浸透クロマトグラフィー (以下、GPC と称す) に供して HA-HZ の分子量

の変化、分解産物の生成パターンを観察した。

【0052】

酵素分解産物のGPCプロファイルを図4に示した。

DMAc混合率が増大するにつれて分解産物の低分子化は著しく抑制された。この傾向はEtOHを混合させた場合にも観察された。ヒアルロニダーゼSDは最終産物として不飽和2糖を生成することが知られているため、基質の認識は未修飾な連続する4糖であると考えられる。従って、有機溶媒の混合により連続する未修飾連鎖が減少するものと考えられた。

〔試験例2〕混合溶媒中で調製したHA-HZの酵素分解性評価（その2）

実施例2-1～2-3、比較例2-1～2-3で得られたHA-HZをそれぞれ試験例1-2)と同様にヒアルロニダーゼSDによる分解性を評価した。

【0053】

酵素分解産物のGPCプロファイルを図5に示した。

それぞれ反応溶媒が異なるだけのほぼ同等のHZ基修飾率を有するHA-HZであるが、混合溶媒（50%EtOH）を反応溶媒としたHA-HZ（実施例2-1～2-3）は、酵素分解による分子量の低下が著しく抑制されたことが示された。

〔試験例3〕血中滞留時間評価

HA投与ラット血漿サンプル；

実施例3-1～3-3の蛍光標識HA修飾物、比較例4-1～4-9の蛍光標識HA修飾物を10mg/kgの用量でラット静脈内に単回投与し、投与前および投与後0.25、1、2、4、6、8、10、12、24、30、54時間（30、54時間は実施例3-1～3-3の蛍光標識HA修飾物のみ）に採血（ヘパリン処理）し、遠心分離により血漿を得た。この血漿サンプルは測定まで-20℃以下で凍結保存した。

測定方法；

GPCにより検量線用標準試料および測定用試料の分析を行う。以下に条件を示す。

GPC Column: TSKgel G6000PWXL

Mobile phase: PBS (pH7.4)

Elution mode: Isocratic

Flow rate: 0.5 mL/min

Injection volume: 40 μ L

Detection: Fluorescence (EX: 490, EM: 518)

測定試料の調製；

・検量線用試料；

各蛍光標識HA修飾物をPBS (pH7.4)を用いて希釈し、1、5、10、50、100、500 μ g/mLおよび0 μ g/mL（対照、PBS (pH7.4)）の標準液を調製する。この標準液に等容量の正常ラット血漿を添加し検量線用試料を調製した。

・測定用試料の調製；

HA修飾物投与ラット血漿サンプルに等容量のPBS (pH7.4)を添加して測定用試料を調製した。

・血漿中のHA修飾物濃度の算出；

解析ソフトMillenniumを用いてピーク面積を算出した。各標準試料のピーク面積から得られた検量線より血漿中のHA修飾物濃度を算出した。

薬物動態データ

実施例3-1～3-3の蛍光標識HA修飾物、比較例4-1～4-9の蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移のデータについて、WinNonlin Ver 3.3 (Pharsight社)で薬物動態学的パラメーターを算出した。各個体の最終測定点3点のデータを用いてモデル非依存的解析を行い、半減期 ($t_{1/2}$)、平均血中滞留時間 (MRT) を算出した。比較例4-1～4-9の蛍光標識HA修飾物の血中濃度推移を図6に示し、算出した薬物動態学的パラメーターを表5に示す。

【0054】

【表5】

表5 FITC標識化HA誘導体の薬物動態学的パラメーター

	MW(Kda)	HZ (%:NMR)	Cl (mL/hr/kg)	MRT (h)	t1/2 (h)
実施例3-1	25	63	4.03±0.3	32.8±1.7	25.2±2.0
実施例3-2	200	67	1.04±0.1	50.2±6.2	35.6±4.7
実施例3-3	600	66	0.994±0.1	49.3±2.4	34.7±1.7
比較例4-3	25	59	12.4±0.7	3.87±0.63	2.40±0.55
比較例4-6	200	71	4.58±0.42	10.1±1.1	7.01±0.78
比較例4-9	600	73	2.52±0.41	16.3±3.7	11.2±2.9

蛍光標識HA修飾物を用いた薬物動態試験により、混合溶媒中で合成した本発明HA修飾物（実施例3-1～3-3）は、水中で合成したHA修飾物のうち、各分子量で最も血中滞留時間の長かったHA修飾物（比較例4-3、4-6、4-9）と比較して、ラット単回静脈内投与後の血中滞留時間が改善されることが確認された。水中で合成したHA修飾物の中で血中半減期（ $t_{1/2}$ ）が 2.40 ± 0.55 （時間）と最も短かった分子量25KDaのHA修飾物は、混合溶媒中で合成することで血中半減期が 25.2 ± 2.0 （時間）となり、10倍以上の血中滞留期間の延長効果が認められた。分子量200KDa、600KDaの各HA修飾物でも、混合溶媒中で合成することにより、3～5倍に血中半減期が延長された。水中で合成したHA修飾物では、HAの分子量に応じて血中滞留期間が延長しており、比較例4-9（600KDa）の血中半減期は、比較例4-3（25KDa）の血中半減期の4.7倍となっていた。混合溶媒中で合成したHA修飾物でも、HAの分子量に応じた血中滞留期間の延長効果が認められ、実施例3-3（600KDa）の血中半減期は、実施例3-1（25KDa）の血中半減期の1.4倍となっていた。平均血中滞留時間（MRT）および血中クリアランス（Cl）についても同様の傾向が見られた。

【0055】

これらの結果から、HAのカルボキシル基の修飾率を上げていけば、相対的に血中滞留時間は延長されるが、水中で修飾したHA修飾物の血中滞留時間延長の限界は低い。この理由は次のように予想される。HAは水中で分子内水素結合と、分子内、外の疎水性相互作用により、2次構造、3次構造を形成していることが知られており（The Biology of Hyaluronan. Chiba Foundation Symposium 143, 6-14 (1989)）、均一な化学修飾が難しくなっていると考えられる。このため、水中でHAのカルボキシル基の多くを修飾しても、HAレセプターに認識されうる連続した4-6糖の未修飾ドメインが一部残存しており、ここが体内のHAレセプターに結合してしまうことで比較的短期間に血中からクリアされてしまうと予想される。

【0056】

水と極性有機溶媒との混合溶媒中ではHAの水素結合、疎水性相互作用が減弱されることでHAの高次構造が壊され、高次構造形成に基づくカルボキシル基周辺環境の不均一性が解消され、より均一な化学修飾が達成されるものと考えられる。

【0057】

ヒアルロン酸修飾物の酵素分解性試験に用いたヒアルロニダーゼは基質認識性が高く、HAを2糖に分解することが知られている。つまり、未修飾4糖が最小の基質であり、分解産物としての2糖は未修飾ユニットが連続するほど生産量が増大する。本発明により得られるヒアルロン酸修飾物がヒアルロニダーゼSDに分解耐性を示すことは、HAレセプターに認識されうる連続した未修飾ドメインが従来の水中での反応で得られる修飾物に比して低減していることを支持している。

【産業上の利用可能性】

【0058】

本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を用いることで、従来の水溶性ヒアルロン酸修飾物では得られない実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長することが可能である。従って、本発明の水溶性ヒアルロン酸修飾物を担体に用い、薬物をコンジュゲート化することで、従来の技術では達成できなかった、実用的でかつ安全な医薬組成物を提供することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】実施例2-1において得られたHA-HZのNMRスペクトル測定結果の一例である。

【図2】実施例2-2において得られたHA-HZのNMRスペクトル測定結果の一例である。

【図3】実施例2-3において得られたHA-HZのNMRスペクトル測定結果の一例である。

【図4】実施例1-4、1-5および1-6、ならびに比較例1-1で得られたHA-HZの各々についての、ヒアルロニダーゼSDに対する酵素分解性試験の結果の一例である。図中の右列のチャートはヒアルロニダーゼSDによる酵素分解後のHA-HZのゲル浸透クロマトグラフィー分析結果を示し、左列のチャートは当該酵素を含まない系についての分析結果を示すものである。

【図5】実施例2-1、2-2および2-3、ならびに比較例2-1、2-2および2-3で得られたHA-HZの各々について、ヒアルロニダーゼSDに対する酵素分解性試験の結果の一例である。

【図6】比較例4-1、4-2、4-3、4-4、4-5、4-6、4-7、4-8および4-9で得られた蛍光標識HA修飾物の血中濃度の推移を示すグラフである。

【図7】実施例3-1、3-2および3-3、ならびに比較例4-3、4-6および4-9で得られた蛍光標識HA修飾物の血中濃度の推移を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】

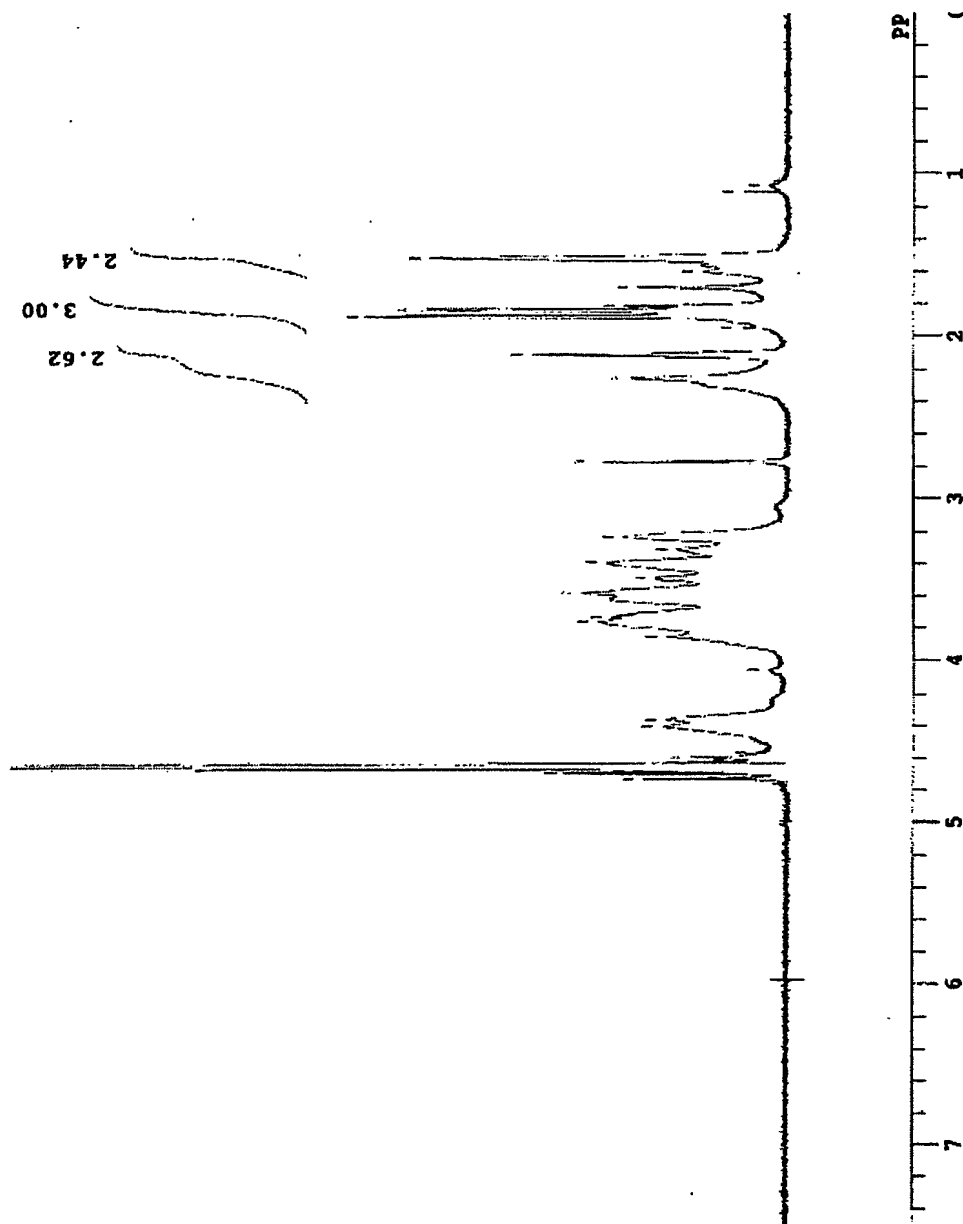


図 1. 実施例 2-1 において得られた HA-HZ の NMR スペクトル

【図2】

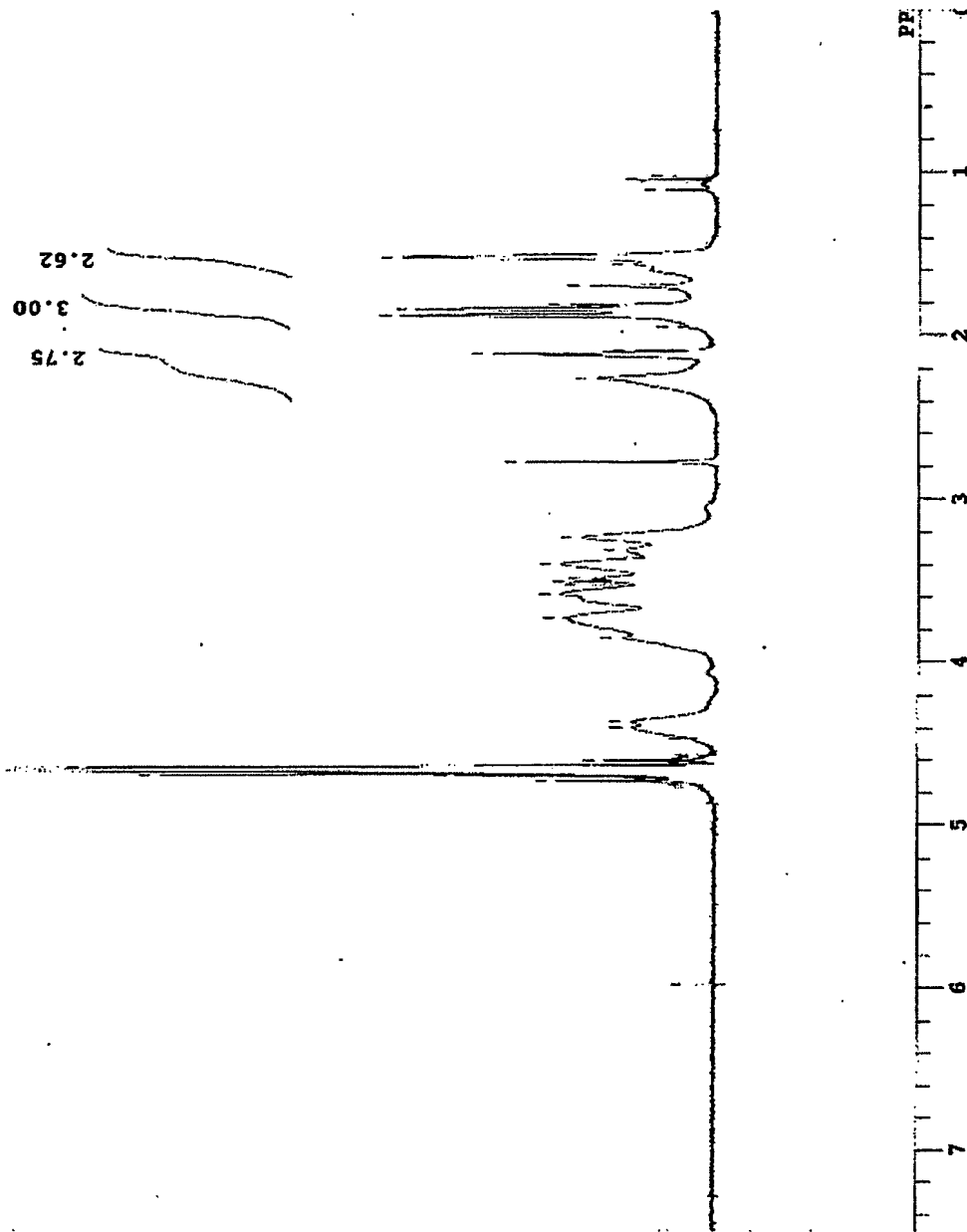


図2. 実施例2-2において得られたHA-HZのNMRスペクトル

【図3】

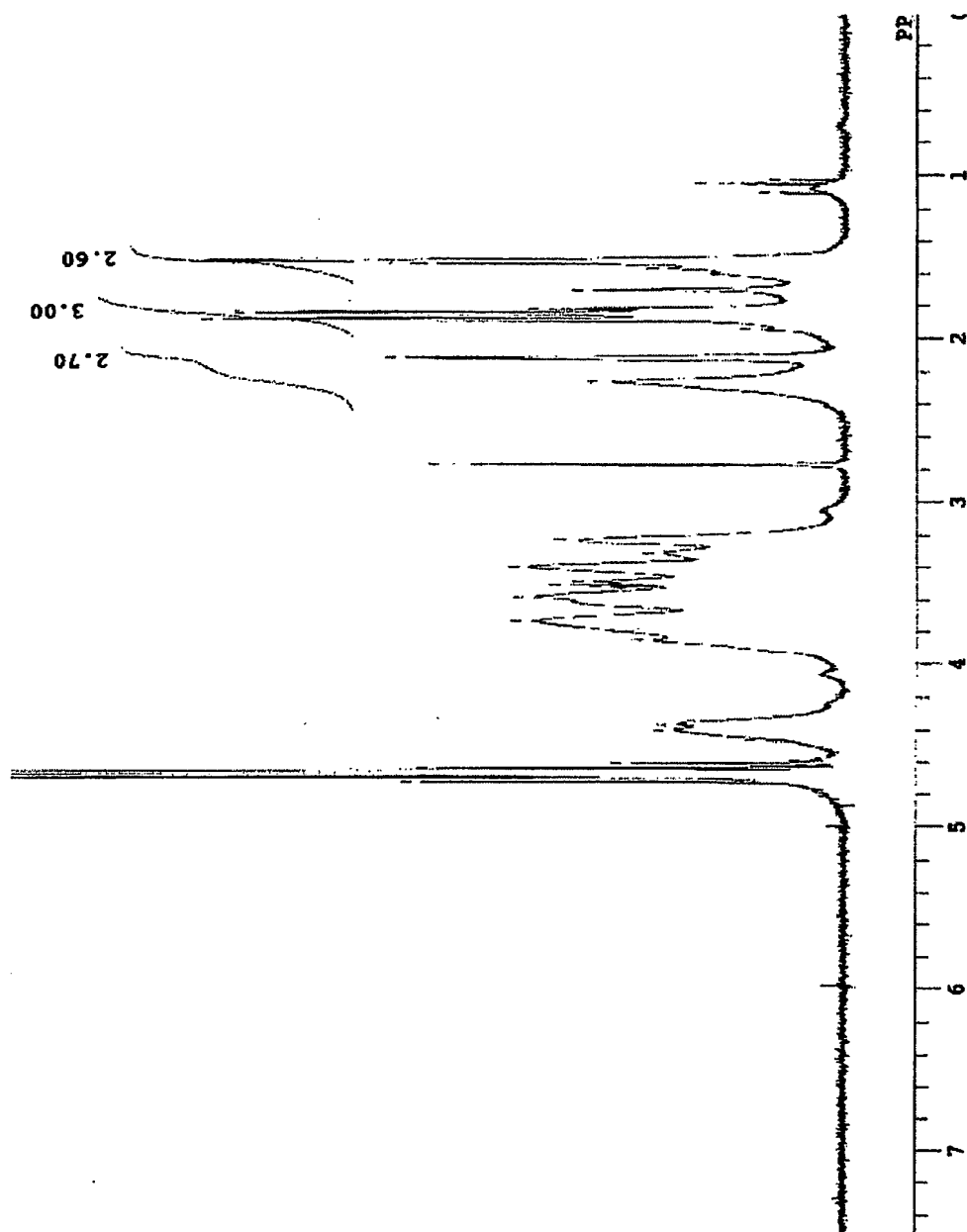
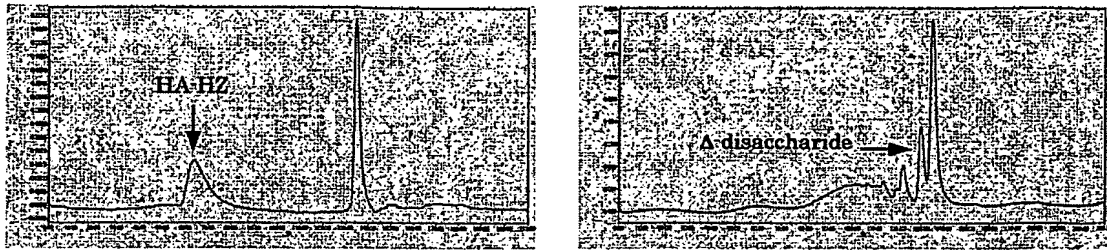


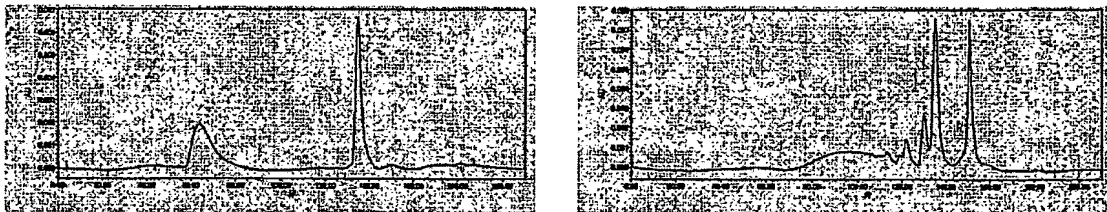
図3. 実施例2-3において得られたHA-HZのNMRスペクトル

【図 4】

比較例 1-1 (反応溶媒: 蒸留水)



実施例 1-6 (反応溶媒: 5% DMAc)



実施例 1-5 (反応溶媒: 20% DMAc)



実施例 1-4 (反応溶媒: 50% DMAc)

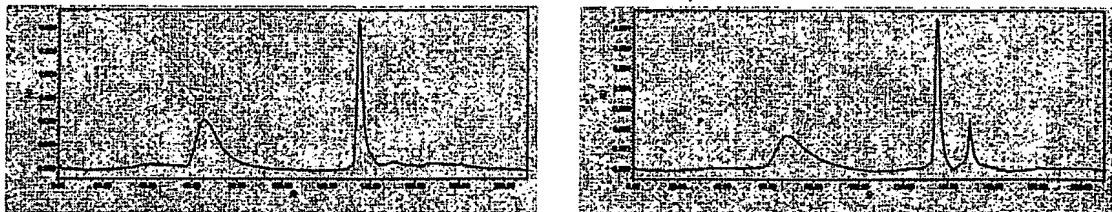


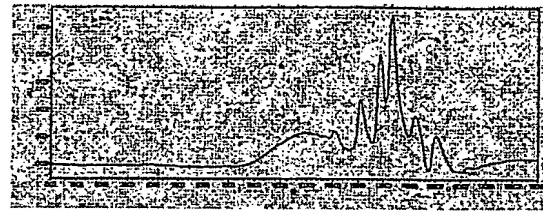
図 4. HA-HZ の酵素分解性評価

(左: ヒアルロニダーゼSDなし、右: ヒアルロニダーゼSDあり)

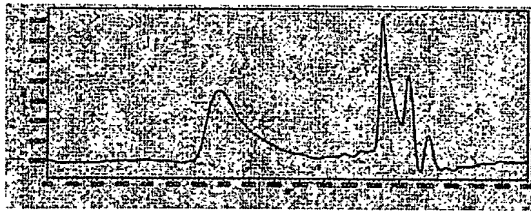
【図 5】



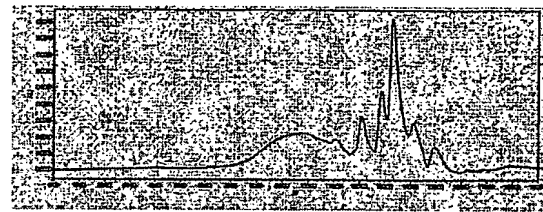
実施例 2-1



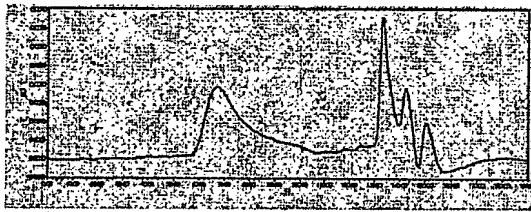
比較例 2-1



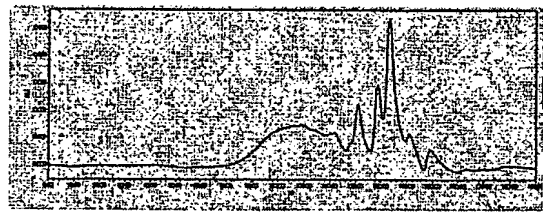
実施例 2-2



比較例 2-2

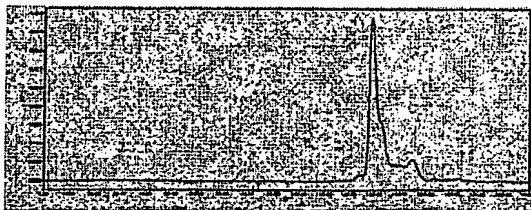


実施例 2-3



比較例 2-3

参考：未修飾ヒアルロン酸



参考：未修飾ヒアルロン酸

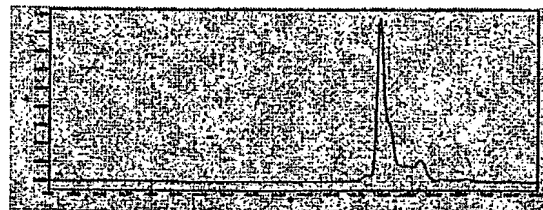


図 5. HA-HZ の酵素分解性評価

【図 6】

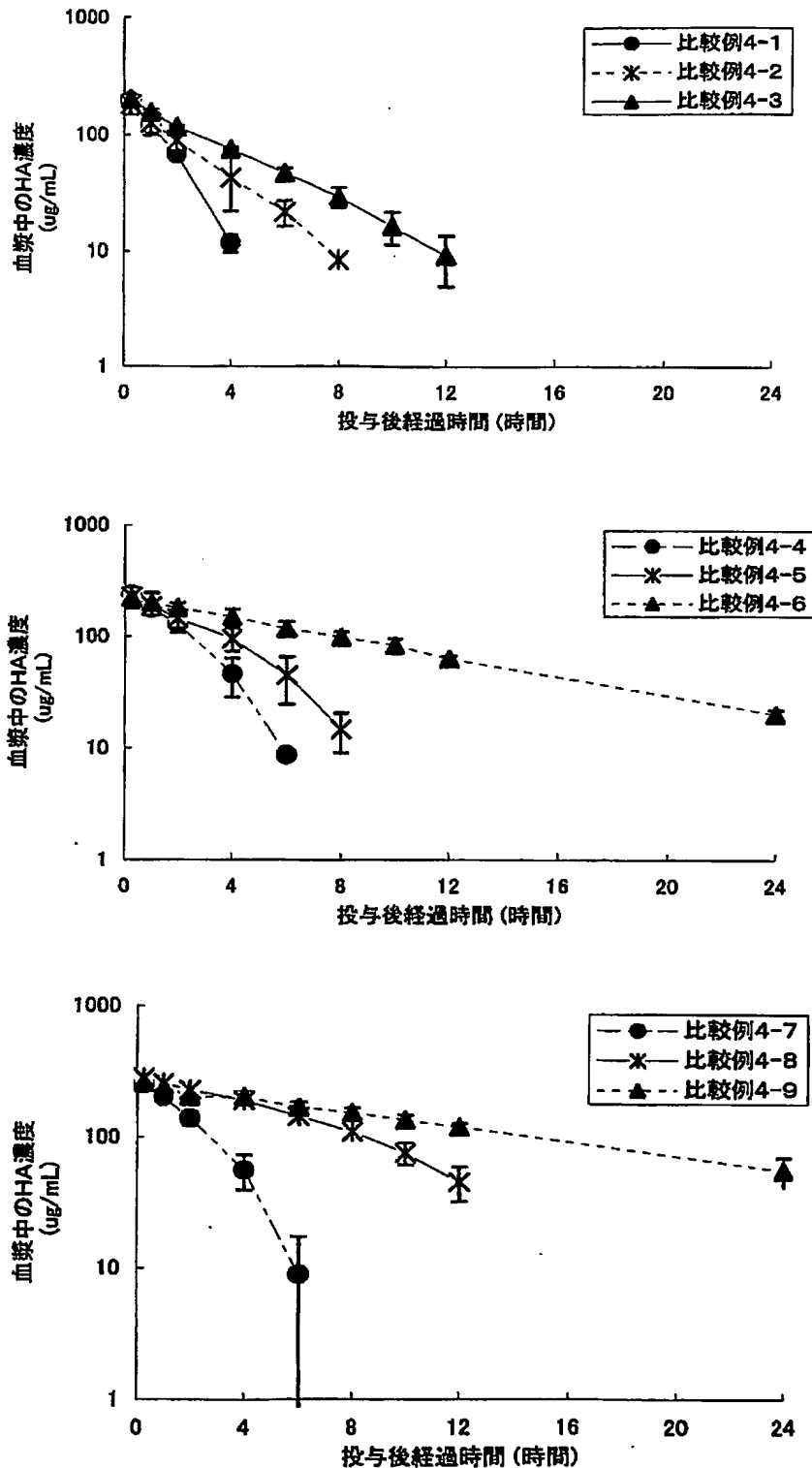


図 6 比較例 4-1 ~ 4-9 の蛍光標識 HA 修飾物の血中濃度推移

【図 7】

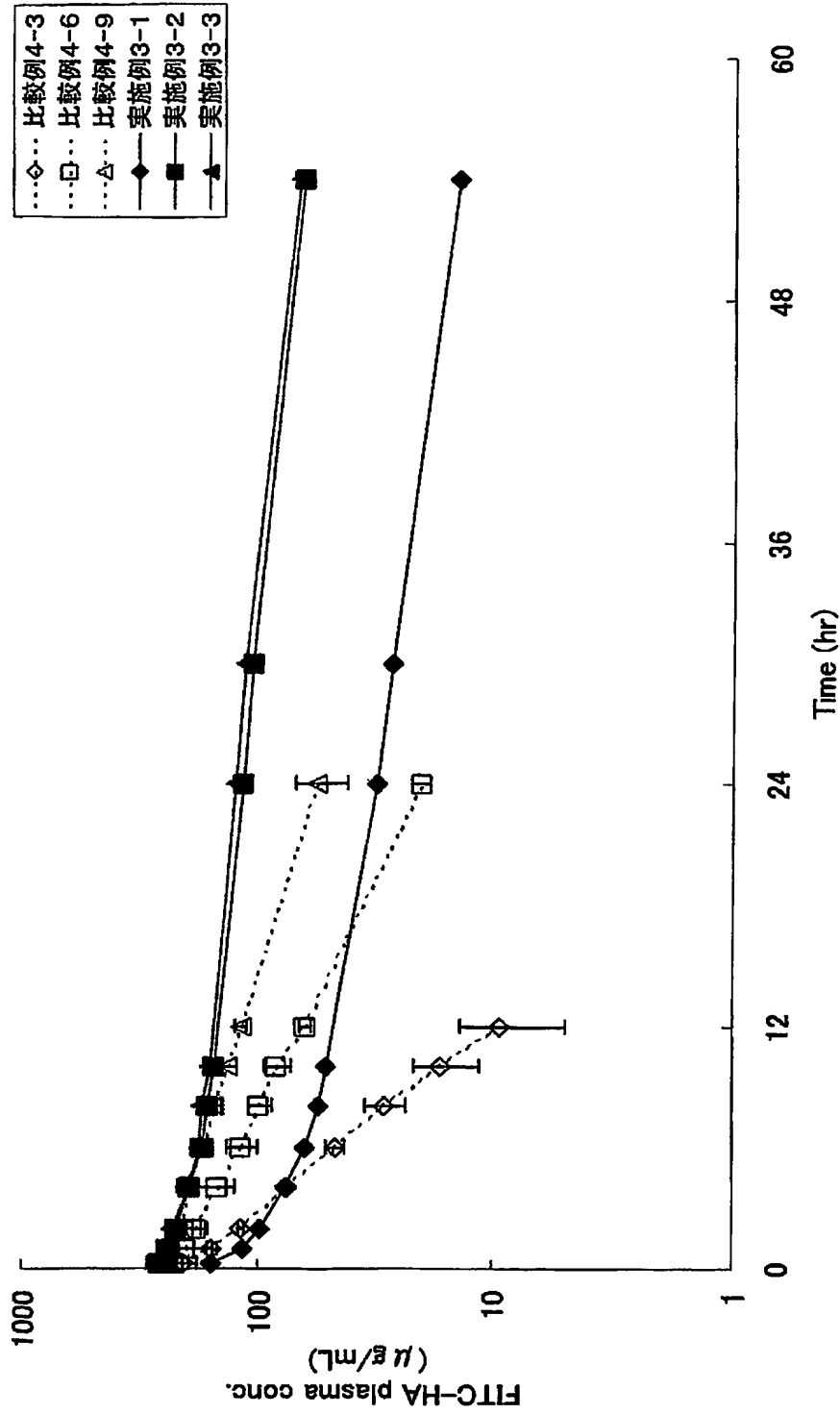


図 7 実施例 3-1、3-2、3-3 の蛍光標識 HA 修飾物、および
比較例 4-3、4-6、4-9 の蛍光標識 HA 修飾物の血中濃度推移

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

薬物担体として実用的な水溶性HA修飾物、及びその製造方法を提供する。

【解決手段】

水と極性有機溶媒との混合溶媒中で、ヒアルロン酸またはその誘導体のグルクロン酸のカルボキシル基に置換基を30モル%以上導入することにより得られた水溶性ヒアルロン酸修飾物は、従来の水溶性ヒアルロン酸修飾物では得られない実用的なレベルまでその血中滞留時間を延長できることを見出した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 0 7 6 8 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 3 3 1 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

氏 名

中外製薬株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/016948

International filing date: 15 November 2004 (15.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-407681
Filing date: 05 December 2003 (05.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 20 January 2005 (20.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse